

Review

BEST AVAILABLE COPY

肝星細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼの発現

高原照美, 渡辺明治
富山医科大学第三内科

MMPs and TIMPs Expression in Hepatic Stellate Cells

Terumi TAKAHARA and Akiharu WATANABE

Third Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Received, 3 October 2000; accepted, 16 October 2000.

Abstract: Hepatic stellate cells (HSCs) are the main cell type to produce ECM as well as matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in the liver, and play important roles in regulating the circumstances of ECM in the liver. We focused on MMPs and TIMPs expression in stellate cells. In normal HSCs, MMP-1, -2, -3, -9, -10, -13, -14, -15, and -16 and TIMP-1, -2 and -3 were detected. In activated HSCs during culture *in vitro*, expression of MMP-1, -3, -9, and -13 were decreased, but MMP-2 and -14 and TIMP-1 and -2 were increased. HSCs in fibrotic liver also show the same regulation as *in vitro*. Nuclear factors SP-1, BTEB 1, and KLF 6 are related to the early activation of HSCs. ECM also regulates the expression of MMPs. When HSCs were cultured in three-dimensional type I collagen gel, expression of MMP-3, -9, -13, and -14 were markedly enhanced, although MMP-2 did not change. Signalling pathway of MMP-9 expression was examined, and was clarified that ERK-1, -2 pathway through integrin $\alpha_2\beta_1$ was important for the induction of MMP-9.

Key words: hepatic stellate cells, MMP, TIMP

はじめに

肝星細胞が肝臓の細胞外マトリックス (ECM) 産生の主要な細胞と同定されて 10 数年が経過したり¹⁾。また一方で近年の分子生物学の進歩に伴い、次々と新しいマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) 分子が同定されるようになり、肝星細胞が肝臓における MMP とそのインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) の産生の中心的役割も果たしていることが知られるようになってきた。本稿では特に肝星細胞における MMP とそのインヒビターの発現、それらの調節について述べる。

1. 肝臓における MMP と TIMP の種類

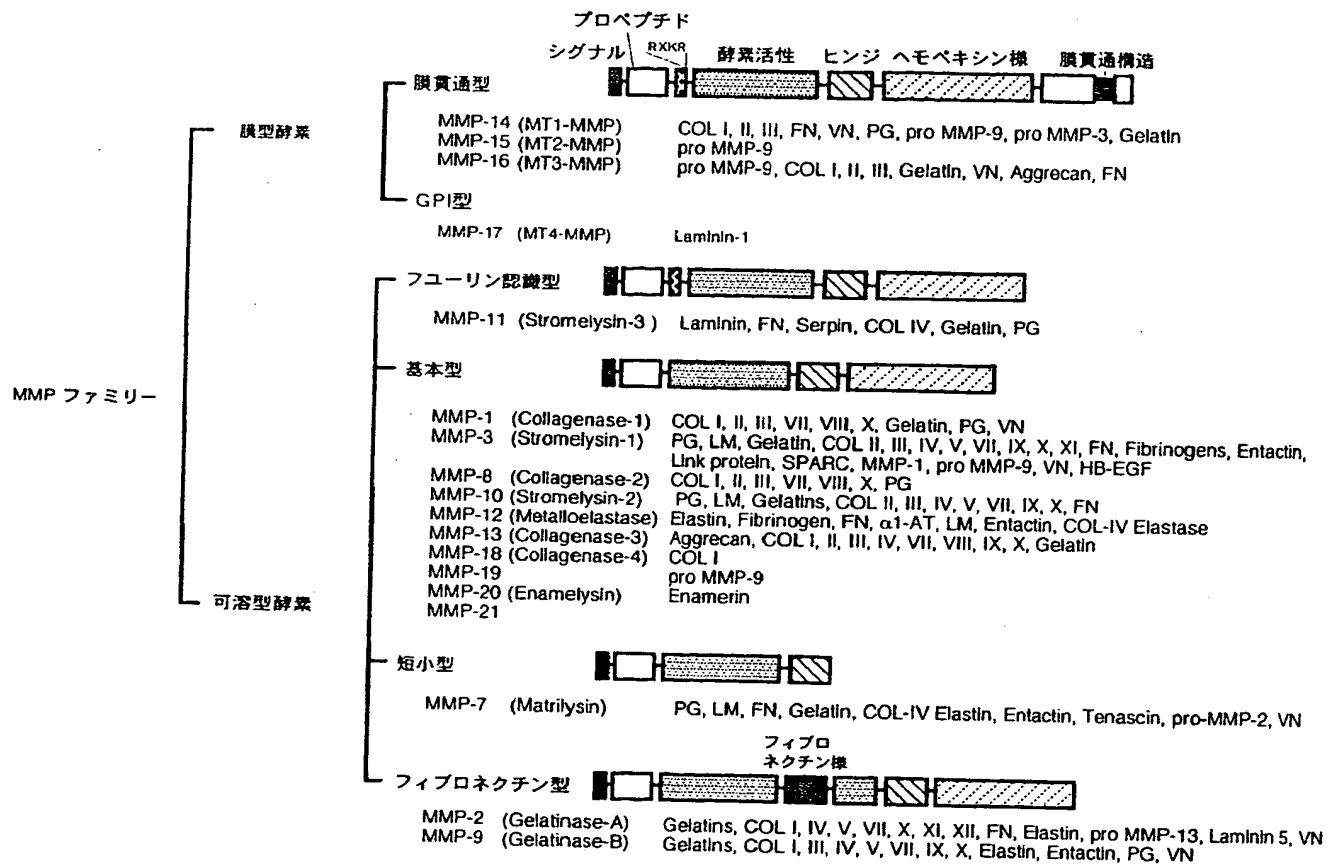
近年の報告によると 20 種類の MMP の遺伝子配列が報告されているが Table 1 に MMP のその一覧を示す。それぞれの詳細については成書²⁾を参照されたい。

このうち肝臓では、MMP-1 (collagenase 1), -2 (gelatinase A), -3 (stromelysin 1), -7 (matrilysin), -9 (gelatinase B), -10 (stromelysin 2), -13 (collagenase 3), -14 (MT 1-MMP), -15 (MT 2-MMP), -16 (MT 3-MMP) の発現が報告されている³⁻⁵⁾。コラゲナーゼとして働く MMP-1, -13 は 1, 2, 3 型コラーゲンを主に分解するが、肝硬変では増加する ECM のうち 1, 3 型コラーゲンが最も多く約 85% を占めしかも構造上安定な分子であることから、コラゲナーゼ群が重要視されている。また 4 型, 5 型コラーゲン, ゼラチンを主に分解するゼラチナーゼ群として MMP-2, MMP-9 は、基底膜コラーゲンである 4 型, 5 型コラーゲンが肝線維化で増加し、特に類洞の毛細血管化に関与することからこれらのゼラチナーゼも重要である。さらに、最近 MMP-2 と、MMP-2 を活性化する MT 1-MMP (MMP-14) も 1 型コラーゲン分解能を有することが報告され、実際の線維化過程とその回復過程にどの MMP

別刷請求先: 高原照美 〒930-0194 富山市杉谷 2630 富山医科大学第三内科

Reprint requests to: Terumi Takahara, Third Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. Tel: +81 74-434 7301, Fax: +81 76-434 5027, e-mail: terutaka-tym@umin.ac.jp

Table 1 MMP family.



Twenty MMPs are reported until now, and each domain structure is shown.
Number of MMPs, its another name, and substrates are listed.

が主に作用しているのか同定が困難である。一方プロテオグリカンやフィブロネクチン、ラミニンなどの糖蛋白を分解するストロメライシン群として MMP-3 も ECM 調節に関与している。

フーリンで活性化されない多くの MMP は細胞外でセリンプロテアーゼや他の MMP によってプロペプチドが切断されて活性化されるが、非活性型 MMP、活性型 MMP とともに特異的な TIMP によって 1:1 モル比で阻害される²⁾。つまり MMP の増加を上回る TIMP が産生されていれば MMP は分解酵素として機能しない。現在 TIMP-1, 2, 3, 4 が知られているがそのうち上記の MMP の阻害は主に TIMP-1, -2 が重要である。肝臓においては TIMP-1, -2, -3 の発現が報告されている。

2. 正常肝星細胞における MMP, TIMP の発現

肝臓は肝実質細胞と 4 種類の類洞壁細胞で構成されているが、正常ラット肝臓から分離した初代培養細胞（肝細胞、星細胞、クッパー細胞）における各種 MMP の発現 (Fig. 1 a, b) をみると、MMP-2, MMP-3, MMP-16 は主に肝星細胞で、MMP-9 はクッパー細胞

で、MMP-13, -14 は星細胞、クッパー細胞で発現されている。一方、TIMP の発現では TIMP-1 は主に星細胞で、TIMP-2 は星細胞、クッパー細胞での発現が確認された。MMP-1 の発現は図では示さないが、星細胞が産生すると報告されている⁹⁾。また MMP-7 の発現は肝癌細胞での発現が報告されている⁷⁾が初代培養系での報告は今のところみられない。つまり肝星細胞は、ECM を産生すると同時に肝臓で発現されるほとんどすべての MMP と TIMP を発現し、肝臓における ECM 調節の中心的役割を果たすと考えられる。同時にクッパー細胞も MMP-9, -13, -14, TIMP-2 を発現し、また肝細胞も MMP-15, TIMP-1 を発現しており、各種の肝病態に応じたそれぞれの役割が考えられる。

3. 活性化肝星細胞における MMP, TIMP の発現の変化

肝星細胞は Disse 腔に存在し、正常では細胞内に多数の脂肪滴を有しビタミン A の代謝を担っている。また筋線維芽細胞のマーカーである desmin や α -smooth muscle actin (α -SMA) を含み、類洞の血管収縮に関与している。初代肝星細胞をプラスチック上に培

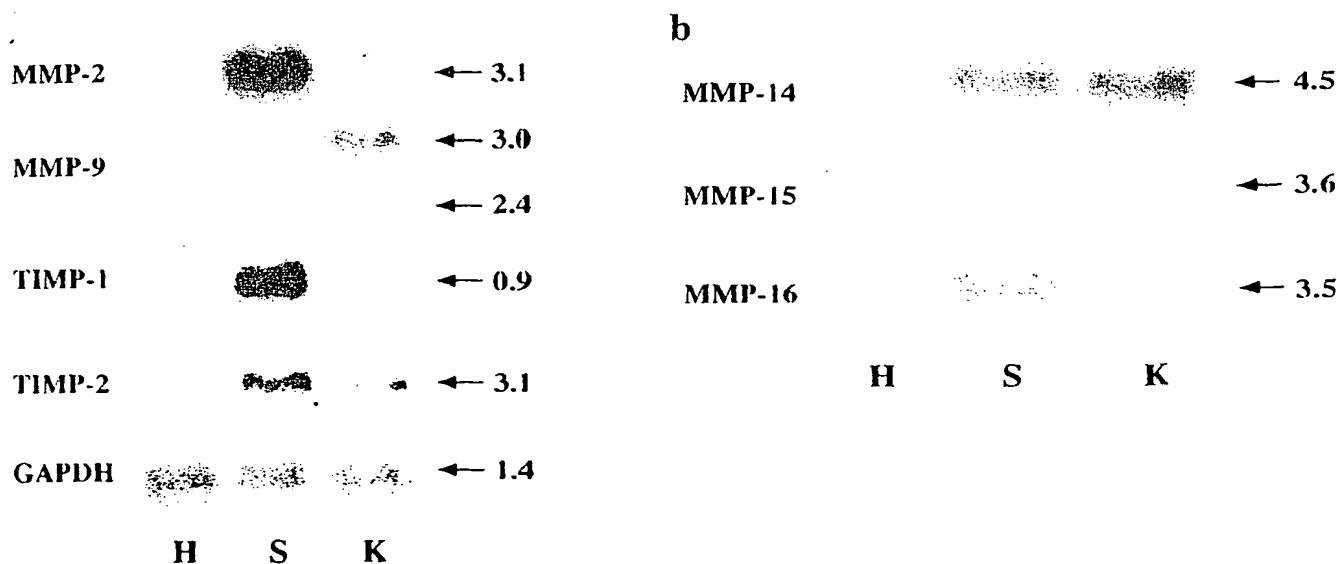


Fig. 1. a and b; MMPs and TIMPs expression in primary cultured liver cells.

H: hepatocyte, S: stellate cell, K: Kupffer cell.

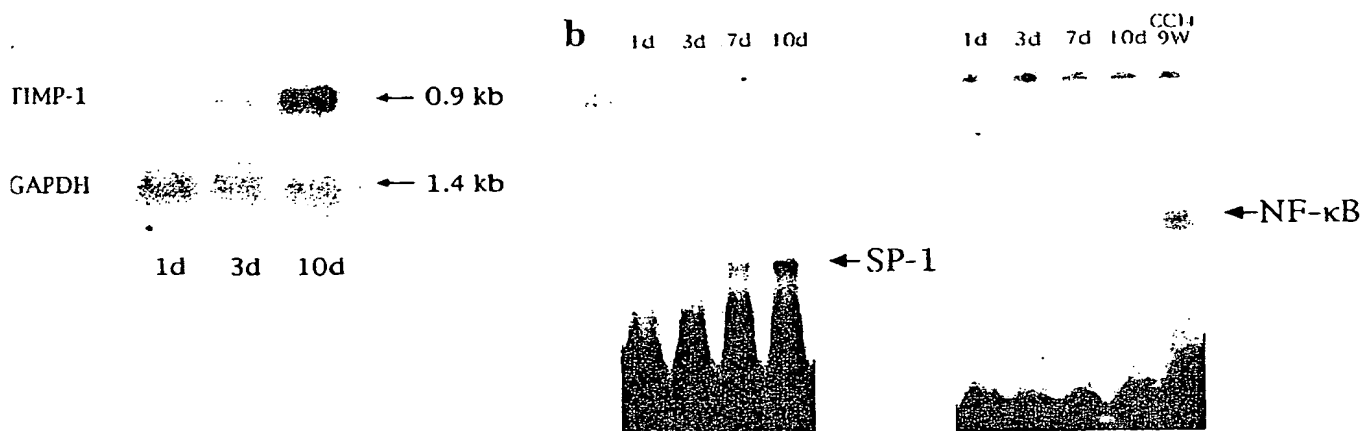


Fig. 2. a; TIMP-1 expression in stellate cells are increased during culture after cell separation. b; SP-1 and NF-κB is increased in stellate cells during culture after cell separation.

The days indicated are after cell separation. CCl₄ 9 W; stellate cells separated from fibrotic liver by chronically CCl₄ treatment.

すると培養後3日目頃より細胞の形態が変化し脂肪滴消失、 α -SMAの増加、細胞外マトリックス産生増活発な増殖が認められ星細胞の活性化(筋線維芽細胞への形質転換)が認められる。これらの変化には多くの報告があり、それらを参照された^{9,10}。初代肝星細胞培養後のMMP-1, -3, -9, -13は養直後より経時的に急激に発現が低下していく(Fig. 参照)。しかしMMP-2, MMP-14は増加する。その方で、TIMPは活性化星細胞で発現が増加する(Fig. 1)。つまり活性化星細胞は多くのMMPの発現が低する一方でTIMPの発現が増加しており、さらにECM産生増加と相まってECM蓄積の傾向にむいていと考えられる。この形質転換した活性化肝星細胞にお

ける分子生物学的研究は近年大いに進んでおり成書を参考されたい^{4),8),9)}。Fig. 2bに星細胞のプラスチック上での培養後の経時的な核内転写因子SP-1, NF-κBの変化を示すが、これらの転写因子も活性化星細胞で増加が著明である。SP-1, BTEB1は初期の星細胞の活性化に関与するとされ、最近報告されたKLF6¹⁰⁾も初期の星細胞の活性化に関わるとされる。これらの転写因子の増加は、MMPやECMを含めた種々の遺伝子の発現を制御している考えられる。またこの転写因子の変化は四塩化炭素慢性障害時の線維肝から分離した星細胞でも同様の現象を示す(Fig. 2b)。つまり*in vitro*における活性化星細胞の変化は*in vivo*の種々の肝病態時の活性化星細胞を反映しているといえる⁹⁾。

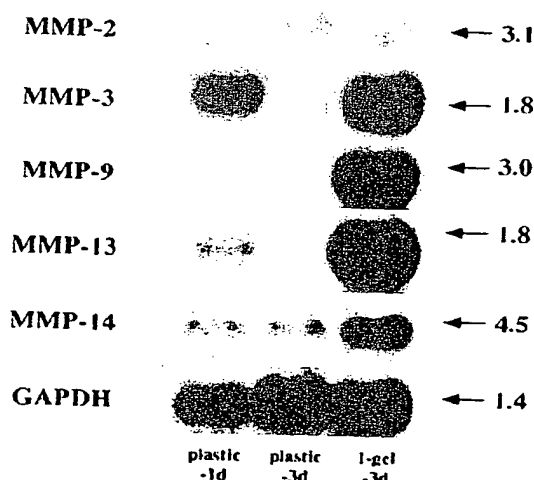


Fig. 3. MMPs expression of stellate cells in both condition on plastic dish for 1 day or 3 days, and in three-dimensional type I collagen gel. MMP-3, -9, -13, -14 expressions are markedly enhanced in type I collagen gel.

4. 肝線維化における MMP, TIMP の変化

各種肝疾患の線維化においても *in vitro* と同様の星細胞の活性化が認められる。詳細は本特集の 5 の項を参照されたい。肝線維化が伸展するときの MMP, TIMP の産生細胞を検討する目的で *in situ* hybridization を施行すると, MMP-2, MMP-14, TIMP-1 とともに慢性肝炎, 肝硬変の線維束内の細長い細胞に陽性シグナルを認めた^{11), 12)}。この部位を免疫組織学的に検討すると星細胞のマーカーである desmin や α -SMA が同時に陽性である。また電顕的にも脂肪滴の減少した活性化した星細胞が多数認められ, 星細胞による MMP, TIMP 産生が確認された。一方小葉内でも細長い細胞に銀粒子の集積を認め, 免疫染色を同時に行うと銀粒子の集積を示す細胞が α -SMA 陽性であり星細胞であることが示された^{11), 12)}。

Iredale ら^{13), 14)} は種々の肝線維化過程では MMP-1 の発現は微増するが TIMP-1 の増加が著明であったと報告している。つまり MMP-1 の増加はほとんどとらえることができず, 一方で TIMP の増加が著明であった。我々のノーザンブロットの結果でもラットの四塩化炭素肝障害の早期 (6 週) では MMP-13 mRNA の発現の増加を認めるが, 中期, 後期にはほとんど発現をとらえることができないものの TIMP の増加は線維化過程を通じて増加していた。つまり線維化過程ではマトリックス産生亢進の一方で, 分解系は TIMP の増加によりむしろ低下していると考えられる。これは種々のヒト肝疾患や実験的線維化モデルで共通に認められる現象である。

線維化回復過程における MMP の発現の報告は少ない。我々の結果では MMP-2 の発現¹⁵⁾ は, 四塩化炭素投与中止時より 1 週間は線維化進展時と同程度増加して

いるがそれ以後は減少した。しかし正常肝に比較するとなお増加していた。また MMP-14 の発現は投与中止時には線維化進展時と同様増加しているが 1 週目には速やかに低下する。最近の Watanabe らの報告¹⁶⁾ では四塩化炭素障害肝の線維化回復過程における MMP-13 mRNA の発現はノーザンブロットではほとんど検出されなかったが PCR において障害終了後の早期に発現が亢進し, *in situ* hybridization でも一部の星細胞に発現がみられた。一方 TIMP の発現も線維化回復過程で徐々に低下していく¹⁷⁾ ことも考慮すると, 線維化回復過程の肝局所では相対的に分解系が優位に働くものと考えられる。

また, 最近線維化改善過程に肝星細胞のアポトーシスが関与していることが報告されている¹⁷⁾。つまり肝非実質細胞, 特に肝星細胞のアポトーシスは四塩化炭素投与中止後 1 週間増加しその後に星細胞数は減少する。これらの結果を総合的にみるとマトリックス産生は著明な減少を示し同時に TIMP 発現の低下により相対的分解系が優位となり線維消失に至ると推定される。

5. 肝星細胞における MMP-1, MMP-13, TIMP-1 の遺伝子発現調節

肝星細胞における MMP, TIMP の発現調節の検討は近年次第に明らかにされつつある。MMP-1, MMP-13 はともに酵素としては類似しており, そのプロモーター構造をみるとともに, Ets 結合部位, TRE (TPA 応答配列) をもち, IL-1, TNF- α , TPA が促進的に働く。しかし, MMP-1 は TGF- β によって発現が抑制されるのに対して MMP-13 は逆に発現が誘導される。これは MMP-1 プロモーターには TGF- β inhibitory element が存在しこれを介して抑制されると考えられる。一方 MMP-13 はこのエレメントがなく TGF- β によって c-Jun, c-Fos, Jun D の発現が誘導されることから MMP-13 の発現亢進がおこると考えられている^{18), 19)}。朴沢らによれば, 培養ヒト肝星細胞 LI-90 を用いた MMP-1 promotor 活性の検討では MMP-1 の発現は TNF- α で増強され, 主に転写因子 NF- κ B, AP-1 site を介してなされることを報告している²⁰⁾。一方 MMP-13 の発現調節機構は肝星細胞では報告されておらず今後肝星細胞での発現調節の報告が期待される。

一方, 肝星細胞における TIMP-1 の発現調節は AP-1, STAT, Ets-1 結合部位の他, あらたに UTE-1 (upstream TIMP-1 element-1) が報告²¹⁾ されており, 活性化星細胞における UTE-1 の増加が TIMP-1 発現を誘導させることが考えられる。

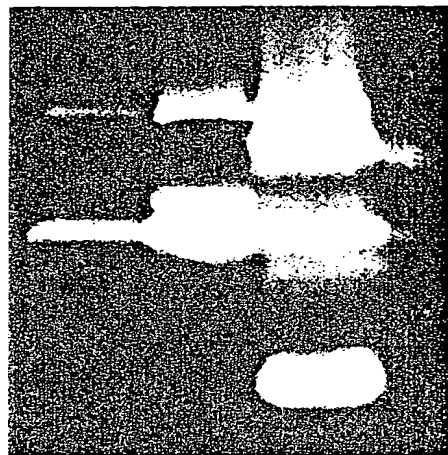
6. ECM による MMP 発現の調節

近年 ECM と各種の細胞との interaction が詳細に検

れている。肝星細胞については本特集の3の項で詳述べられているので参照されたい。ここではECMるMMPの発現調節とそのメカニズムについて述

enooraによると肝星細胞をI型collagen-gel (I-gel) 内で3次元培養すると、他のECMに比較して最も細胞増殖が抑えられECMの産生も抑制されたとい。また肝星細胞をI-gel内で培養を行うとI-gelは週間で分解される。我々はこの現象に興味をもってこのMMPの発現を検討した。Fig. 3に示すようにI-gel内ではMMP-3, -9, -13, -14の発現が著明に増加。しかしMMP-2の変化はほとんどみられなかった。I-gel内で3日間培養し、3日目の培養液を採取しゼラチンゼイモグラフィーを施行するとプラスチックと比較して92 kd (非活性型MMP-9), 82 kd (活性型MMP-9) のバンドが著明に増強して確認された (Fig.

cond plastic I-gel
med 3d 3d

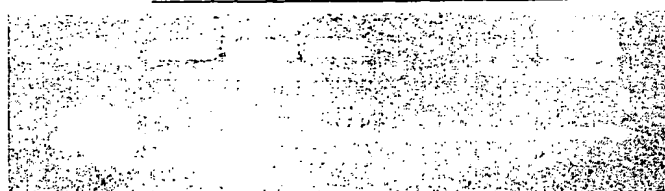


← 92 kD
← 82 kD
← 66 kD
← 62 kD
← 46 kD

4. Zymography of culture medium of stellate cells. In stellate cells are cultured in type I collagen-gel, increased MMP-9 activity is detected. Further active MMP-9 at 82 kd and active MMP-2 at 62 kd is detected. Cond med is also newly appears. Cond med: conditioning medium containing 2% fetal calf serum.

4). また62 kdの活性型MMP-2, さらに46 kdのバンドもみられた。培養2日目に培養液にBB-96, TIMP-1, TIMP-2, アプロチニンを添加して1日間培養するとBB-96, TIMP-2は82 kdの抑制, 62 kd, 46 kdの阻害を示した。TIMP-1も82 kdの抑制, 46 kdの阻害を示したが62 kdのバンドには変化がなかった。またアプロチニン添加では全く変化がみられなかった。I-gel内でMMP-9, MMP-2が活性化され, また46 kdがMMP活性をもつことは疑いがないがこれがMMP-9の活性型フォームであるのか他のMMPであるのか今のところ不明である。さらにI-gel内でのMMP-9発現の増強のメカニズムについて検討した。分離星細胞をintegrin $\alpha_2\beta_1$ 中和抗体で反応後, 細胞をI-gel内に播き培養液にintegrin $\alpha_2\beta_1$ 中和抗体を添加して約1日間培養し上清をゼラチンゼイモグラフィーで検討するとMMP-9の発現は抑制された。さらにどのシグナル経路を介するか検討すると, tyrosin kinase inhibitorであるgenistein, herbimycinで約1日間処理によりMMP-9の発現は抑制された。一方MAPKの特異的inhibitor, PD 98059 (ERK 1, 2 inhibitor), SB 203580 (p 38 inhibitor) で処理するとPD 98059ではMMP-9の発現は抑制されるのに対してSB 203580はむしろ誘導された (Fig. 5)。我々はすでに星細胞はI-gel内の培養において15分後の早期からMAPKの3つのリン酸化ERK-1, -2, p-38, SAPKがすべて増加していることを確認しているがMMP-9の誘導はintegrin $\alpha_2\beta_1$ を介し, さらにMAPKのうちERK-1, -2の経路を通してシグナルが伝達されると考えられた (Fig. 6)。MMP-9のシグナル経路については同様のことがkeratinocyteで報告されている²³⁾。またI-gel内での線維芽細胞の培養系におけるMMP-13のシグナルについての報告²⁴⁾ではP 38を介することを考えるとMMP-9とMMP-13は異なったシグナルを介すると考えられる。

P C Int Gen Her PD SB
 $\alpha_2\beta_1$ I-Col-gel 98059 203580



← 92 kd
← 66 kd

Fig. 5. Zymography of culture medium of stellate cells in type I collagen gel. The cells are treated with anti- $\alpha_2\beta_1$ integrin antibody, genistein, herbimycin A, PD 98059, or SB 203580 for 24 h.

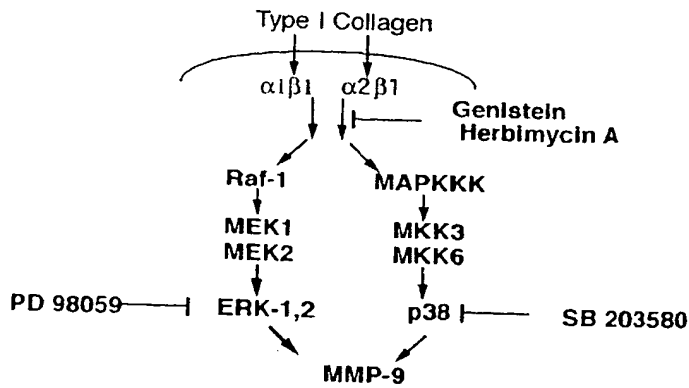


Fig. 6. Signalling pathway of MMP-9 which enhanced by the interaction with type I collagen.

結 論

この項では肝星細胞の MMP と TIMP の発現について最近の知見を概説したが、肝線維化進展とその改善にとって ECM 分解は不可欠であり、その点星細胞を研究することは重要である。これらの知見をふまえ今後の線維化治療法の開発が望まれる。また星細胞の多岐にわたった機能を考えると、この細胞の細胞機能の解析とその制御は、線維化の治療のみならず肝臓での炎症、門脈圧亢進、ビタミン A 代謝、肝転移の制御など多くの肝疾患にとってまだまだ検討することが残されている。今後ますます研究が進むよう期待する。

文 献

- 1) Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J., and Bissell, D. M. (1985) Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8681-8685
- 2) Nagase, H., and Woessner, J. F. (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-21494
- 3) Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F., and Ramadori, G. (1999) Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117, 1205-1221
- 4) Friedman, S. L. (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response of tissue injury. *J. Biol. Chem.* 275, 2247-2250
- 5) Arthur, M. J. P. (2000) Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G 245-G 249
- 6) Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., et al. (1994) Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am. J. Pathol.* 144, 528-537
- 7) Lichtingagen, R., Helmbrecht, T., Arndt, B., and Boker, K. H. (1995) Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33, 65-71
- 8) Pinzani, M., Marra, F., and Carloni, V. (1998) Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 18, 2-13
- 9) Kristensen, D. B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Yaten, C., Seki, S., Kuroki, T., and Yoshizato, K. (2000) Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32, 268-277
- 10) Ratzliff, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S., and Friedman, S. L. (1998) Zf 9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9500-9505
- 11) Takahara, T., Furui, K., Yata, Y., Jin, B., Zhang, L. P., Nambu, S., Sato, H., Seiki, M., and Watanabe, A. (1997) Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 26, 1521-1529
- 12) Yata, Y., Takahara, T., Furui, K., Zhang, L. P., Jin, B., and Watanabe, A. (1999) Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J. Hepatol.* 30, 425-431
- 13) Iredale, J. P., Benyon, R. C., Arthur, M. J., Ferris, W. F., Alcolado, R., Winwood, P. J., Clark, N., and Murphy, G. (1996) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 24, 176-184
- 14) Benyon, R. C., Iredale, J. P., Goddard, S., Winwood, P. J., and Arthur, M. J. (1996) Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 110, 821-831
- 15) Takahara, T., Furui, K., Funaki, J., Nakayama, Y., Itoh, H., Miyabayashi, C., Sato, H., Seiki, M., Ooshima, A., and Watanabe, A. (1995) Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 21, 209-218
- 16) Watanabe, T., Niioka, M., Hozawa, S., Kameyama, K., Hayashi, T., Arai, M., Ishikawa, A., Maruyama, K., and Okazaki, I. (2000) Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J. Hepatol.* 33, 224-235
- 17) Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C., and Arthur, M. J. (1998) Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 102, 538-549
- 18) Pendas, A. M., Balbin, M., Llano, E., Jimenez, M. G., and Lopez-Otin, C. (1997) Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP-13). *Genomics* 40, 222-233
- 19) Uribe, A., Jimenez, M. G., Balbin, M., Freije, J. M. P., and Lopez-Otin, C. (1998) Differential effects of transforming growth factor-β on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 273, 9769-9777
- 20) 朴沢重成, 他 (1999) TNFα による、ヒト肝由来星細胞 LI 90 における MMP-1 (間質コラゲナーゼ) の遺伝子転写調節機構. 第 13 回肝臓洞壁細胞研究会記録, 12-13
- 21) Trim, J. E., Samra, S. K., Arthur, M. J., Wright, M. C., McAulay, M., Beri, R., and Mann, D. A. (2000) Upstream tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory

DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30-kDa nuclear protein. *J. Biol. Chem.* 275, 6657-6663

Senoo, H., Imai, K., Sato, M., Kojima, N., Miura, M., and Hata, R. (1996) Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell Biol. Int.* 20, 501-512

McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V., and Hud-

son, L. G. (1999) Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J. Biol. Chem.* 274, 4347-4353

24) Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C., and Kahari, V. M. (1999) Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 2446-2455

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

